

## Σετ αντιδραστηρίων Pointe Acid Phosphatase

### Προβλεπόμενη χρήση

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της όξινης φωσφατάσης σε ορό. **Rx Only**

### Κλινική σηματικότητα

Υψηλά επίπεδα προστατικής όξινης φωσφατάσης ανιχνεύονται σε περιπτώσεις μεταστατικού καρκίνου του προστάτη. Καθώς η όξινη φωσφατάση παράγεται και σε άλλους ιστούς, το προστατικό ισόένζυμο πρέπει να διαχωρίζεται από το μη προστατικό για την ακριβή διάγνωση. Υψηλά επίπεδα μη προστατικής όξινης φωσφατάσης έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με νόσο Paget, υπερπαραθυρεοειδισμό με σκελετικές εκδηλώσεις, καθώς και σε καρκίνους που έχουν πλήξει τα οστά.<sup>7</sup>

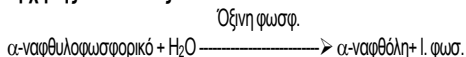
### Ιστορικό μεθόδου

Οι φωσφορικές ενώσεις που έχουν προταθεί σε βάθος χρόνων ως υποστρώματα για τη μέτρηση της δραστηριότητας της όξινης φωσφατάσης, περιελάμβαναν φαινύλοφωσφορικό, α-γλυκερολφωσφορικό, ρ-νιπροφαινύλ-φωσφορικό και θυμολοφθαλεΐνη φωσφορική. Τα περισσότερα από τα παραπάνω υποστρώματα είτε δεν είχαν ευαισθησία στη μικρή αύξηση της δραστηριότητας της προστατικής όξινης φωσφατάσης είτε ήταν εξαιρετικά ευαίσθητα στη μη προστατική όξινη φωσφατάση στον ορό. Οι Roy et al<sup>1</sup> πρότειναν το 1971 μια μέθοδο που χρησιμοποιεί μονοφωσφορική θυμολοφθαλεΐνη νατρίου ως ειδικό υπόστρωμα για την προστατική όξινη φωσφατάση. Μια τροποποίηση από τους Ewen και Spitzer<sup>2</sup> το 1976 βελτίωσε την ευαισθησία της μεθόδου του Roy. Αν και η τροποποιημένη μέθοδος έχει γίνει ευρέως αποδεκτή, παραμένει μια μακρόχρονη και κουραστική διαδικασία, ενώ παράλληλα δεν έχει απόλυτη ειδικότητα για την προστατική όξινη φωσφατάση, καθώς μετρά και την όξινη φωσφατάση των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων.

Το 1959, οι Babson et al<sup>3</sup> πρότειναν το α-ναφθολοφωσφορικό ως ειδικό υπόστρωμα για την προστατική όξινη φωσφατάση. Η ειδικότητα αμφισβητήθηκε από τον Amador<sup>4</sup> το 1969.

Ο Hillman<sup>5</sup> πρότεινε το 1971 μια μέθοδο που περιλάμβανε diazotized 2-αμινο-5-χλωροτολουόλιο (Fast Red TR) που σχηματίζει μια χρωστική diazo με ισχυρή απορρόφηση στα 405 nm. L-τρονικό χρησιμοποιήθηκε ως ειδικός αναστολέας της προστατικής όξινης φωσφατάσης για τον διαφορικό καθορισμό της ποσότητας του προστατικού ισόενζυμου.<sup>6</sup> Η παραπάνω κινητική μέθοδος είναι ειδική, γρήγορη, απλή και μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα σε αυτοματοποιημένο εξοπλισμό.

### Αρχή της διαδικασίας



Το α-ναφθολοφωσφορικό υδrolύεται από την όξινη φωσφατάση ορού σε α-ναφθόλη και ανόργανα φωσφορικά. Ο ρυθμός της υδρόλυσης είναι ανάλογος της δραστηριότητας του ενζύμου. Η α-ναφθόλη που παράγεται συζεύνεται με το Fast Red TR για να παράξει ένα έγχρωμο σύμπλοκο που απορροφά το φως στα 405 nm. Η αντίδραση μπορεί να ποσοτικοποιηθεί φωτομετρικά επειδή η αντίδραση ζεύξης είναι ακαριαία. Το L-τρονικό αναστέλλει την προστατική όξινη φωσφατάση αλλά δεν προκαλεί παρεμβολές στον μηχανισμό της αντίδρασης. Συνεπώς, αν η εξέταση γίνεται παρουσία και απουσία L-τρονικού, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο δοκιμασιών προσδιορισμού είναι το επίπεδο της προστατικής όξινης φωσφατάσης στον ορό.

### Αντιδραστήρια

1. Αντιδραστήριο Acid Phosphatase (Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στο ανασυσταμένο αντιδραστήριο): α-ναφθολοφωσφορικό 3 mM, Fast Red TR 1 mM, κτηρικό οξύ 20 mM, κτηρικό νάτριο 60 mM, pH 5,3 ± 0,1.
2. Αντιδραστήριο L-Tartrate Reagent (Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στο ανασυσταμένο αντιδραστήριο): Νάτριο L-τρονικό 2 M, κτηρικό οξύ 70 mM, κτηρικό νάτριο 10 mM, pH 5,3 ± 0,1.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος: 5 M, pH 5,0.

### Προετοιμασία αντιδραστηρίων

1. Εκτελέστε ανασύσταση του αντιδραστηρίου όξινης φωσφατάσης με τον όγκο απεσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα. Στροβιλίστε για να διαλυθεί.
2. Εκτελέστε ανασύσταση του αντιδραστηρίου L-Tartrate Reagent με 5,0 mL απεσταγμένου νερού. Θερμάνετε το αντιδραστήριο για να διευκολύνετε την αραιώση, αν είναι απαραίτητο.
3. Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος είναι έτοιμο για χρήση.

### Αποθήκευση αντιδραστηρίων

1. Τα μη ανοιγμένα φιαλίδια παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου όταν φυλάσσονται υπό ψύξη (2 – 8°C).
2. Το ανασυσταμένο αντιδραστήριο όξινης φωσφατάσης είναι σταθερό για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (22 – 28°C) και για 14 ημέρες κατεψυγμένο (2 – 8°C).
3. Το ανασυσταμένο αντιδραστήριο L-Tartrate Reagent είναι σταθερό υπό ψύξη (2 – 8°C), μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Σε περίπτωση κρυστάλλωσης, θερμάνετε σε μέτρια θερμοκρασία (40 – 50°C) μέχρι να διαλυθεί.
4. Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος είναι σταθερό υπό ψύξη (2 – 8°C) μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

### Αλλοίωση αντιδραστηρίου

Το αντιδραστήριο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται εάν:

1. Το ανασυσταμένο αντιδραστήριο όξινης φωσφατάσης, χωρίς πρόσθετο ορό, έχει απορρόφηση άνω του 0,300 κατά τη μέτρηση στα 405 nm έναντι νερού.
2. Το L-Tartrate Reagent ιζηματοποιείται. Θερμάνετε (40 – 50°C) για την εκ νέου διάλυση του αντιδραστηρίου.

### Προφυλάξεις

Αυτό το αντιδραστήριο προορίζεται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

### Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

1. Χρησιμοποιείτε μόνο διαυγή, μη αιμολυμένο ορό.
2. Ο ορός πρέπει να διαχωρίζεται από τον θρόμβο εντός δύο ωρών από τη συλλογή.
3. Η δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης είναι εξαιρετικά ασταθής σε θερμοκρασία δωματίου. Η σταθεροποίηση του ενζύμου είναι εφικτή μόνο μέσω της αύξησης της οξύτητας με το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος που παρέχεται. **Προσθέστε 20 uL (0,02 mL) ρυθμιστικού διαλύματος ανά 1,0 mL ορού. Αναμείξτε.** Τα επεξεργασμένα δείγματα ορού θα παραμείνουν σταθερά για 7 ημέρες όταν φυλάσσονται υπό ψύξη σε θερμοκρασία 2 – 8°C.<sup>8</sup>
4. Μην χρησιμοποιείτε πλάσμα. Ορισμένα αντιπηκτικά αναστέλλουν τη δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης ή/και προκαλούν θολερότητα.<sup>9</sup>

### Αλληλεπιδράσεις

1. Τα υψηλά επίπεδα χολερυθρίνης (ικτερικά δείγματα) έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης που προσδιορίζεται μέσω αυτής της διαδικασίας.<sup>10</sup>
2. Ορισμένα φάρμακα και ουσίες επηρεάζουν τη δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης. Οι Young, et al<sup>11</sup> έχουν δημοσιεύσει μια πλήρη λίστα των παραπάνω.

### Παρεχόμενα υλικά

1. Acid Phosphatase Reagent.
2. L-Tartrate Reagent.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος.

### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

1. Συσκευές αναρρόφησης με πιπέτα ακριβείας
2. Δοκιμαστικά σωληνάρια/υποδοχείας
3. Χρονόμετρο
4. Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα ανάγνωσης στα 405 nm.
5. Απεσταγμένο/απιονισμένο νερό.
6. Η θερμοκρασία πρέπει να ελέγχεται στενά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας προσδιορισμού. Πρέπει να χρησιμοποιείται κυβέτα ελεγχόμενης θερμοκρασίας (30 ή 37°C).

### Διαδικασία (Αυτοματοποιημένη)

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του συγκεκριμένου οργάνου.

### Διαδικασία (χειροκίνητη)

Σημείωση: Σταθεροποιήστε την όξινη φωσφατάση αμέσως μετά τον διαχωρισμό του ορού από τον θρόμβο προσθέτοντας 20 uL (0,02 mL) ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος ανά 1,0 mL ορού. Αναμείξτε και φυλάξτε σε ψυγείο έως ότου είστε έτοιμοι να εκτελέσετε τη δοκιμασία προσδιορισμού.

# Σετ αντιδραστηρίων Pointe Acid Phosphatase

## A. Ολική Οξίνη Φωσφατάση

1. Εκτελέστε ανασύσταση του αντιδραστηρίου σύμφωνα με τις οδηγίες.
2. Τοποθετήστε στα σωληνάρια ετικέτες, "Μάρτυρας", "Ασθενής", κ.λπ.
3. Προσθέστε με πιπέτα 1,0 mL αντιδραστηρίου σε όλα τα σωληνάρια.
4. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο με νερό στα 405 nm. Ορίστε τη θερμοκρασία της κυβέτας στους 30 ή 37°C.
5. Προσθέστε 100 uL (0,100 mL) δείγματος στο αντίστοιχο σωληνάριο και αφήστε το να επωαστεί για πέντε λεπτά.
6. Μετά την επώαση, διαβάστε και καταγράψτε τις τιμές απορρόφησης κάθε λεπτό για πέντε λεπτά για να καθορίσετε το ΔΑ/λεπτό.
7. Επαναλάβετε τη διαδικασία για κάθε δείγμα.
8. Οι τιμές (uL) λαμβάνονται πολλαπλασιάζοντας το ΔΑ/λεπτό επί τον συντελεστή. Βλ. "Υπολογισμός".

## B. Μη προστατική οξίνη φωσφατάση

1. Προσθέστε 1,0 mL αντιδραστηρίου στο σωληνάριο με την κατάλληλη ετικέτα.
2. Προσθέστε 10 uL (0,010 mL) αντιδραστηρίου L-τρονικού και αναμείξτε.
3. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο με νερό στα 405 nm. Ορίστε τη θερμοκρασία της κυβέτας στους 30 ή 37°C.
4. Προσθέστε 100 uL (0,100 mL) δείγματος και αναμείξτε για πέντε λεπτά.
5. Μετά την επώαση, διαβάστε και καταγράψτε τις τιμές απορρόφησης κάθε λεπτό για πέντε λεπτά για να καθορίσετε το ΔΑ/λεπτό.
6. Οι τιμές (uL) λαμβάνονται πολλαπλασιάζοντας το ΔΑ/λεπτό επί τον συντελεστή. Βλ. "Υπολογισμός".

## C. Προστατική Οξίνη Φωσφατάση

1. Η τιμή λαμβάνεται αφαιρώντας το αποτέλεσμα της δοκιμασίας προσδιορισμού μη προστατικής οξίνης φωσφατάσης (B) από τη δοκιμασία προσδιορισμού ολικής οξίνης φωσφατάσης (A).

## Περιορισμοί

Τα δείγματα με τιμές πάνω από 35 u/L στους 30°C ή πάνω από 40 u/L στους 37°C, πρέπει να αραιώνονται με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:9, πρέπει να υποβάλλονται σε εκ νέου σε δοκιμασία προσδιορισμού και το τελικό αποτέλεσμα πρέπει να πολλαπλασιάζεται επί 10.

## Υπολογισμός

Μία διεθνής μονάδα ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μεταβολή ενός μικρομορίου (micromole) υποστρώματος ανά λεπτό υπό καθορισμένες συνθήκες.

### A. Υπολογισμός ολικής οξίνης φωσφατάσης.

$$\frac{\Delta A/\text{λεπ.} \times 10^6 \times 1,1}{12,9 \times 10^3 \times 1,0 \times 0,1} = u/L = \Delta A/\text{λεπ.} \times 853$$

### B. Υπολογισμός μη προστατικής οξίνης φωσφατάσης.

$$\frac{\Delta A/\text{λεπ.} \times 10^6 \times 1,11}{12,9 \times 10^3 \times 1,0 \times 0,1} = u/L = \Delta A/\text{λεπ.} \times 860$$

Όπου:

- 10<sup>6</sup> = Μετατροπή των γραμμωρίων σε χιλιοστογραμμωμάρια
- 1,1 = Ολικός όγκος αντίδρασης (ολική οξίνη φωσφατάση)
- 1,11 = Ολικός όγκος αντίδρασης (Μη προστατική οξίνη φωσφατάση)
- 12,9 x 10<sup>3</sup> = Γραμμωριακή απορροφητικότητα του συμπλόκου Fast Red TR α-ναφθόλης στα 405 nm.
- 1,0 = Διαδρομή φωτός σε cm.
- 0,1 = Όγκος δείγματος (mL).

Υπολογισμοί δείγματος:

ΔΑ/λεπ. ολική οξίνη φωσφατάση = 0,010

ΔΑ/λεπ. Μη προστατική οξίνη φωσφατάση = 0,009

Ολική οξίνη φωσφατάση: 0,010 x 853 = 8,5 u/L

Μη προστατική οξίνη φωσφατάση: 0,009 x 860 = 7,7 u/L

Προστατική οξίνη φωσφατάση: 8,5 - 7,7 = 0,8 u/L

## Ποιοτικός έλεγχος

1. Η ακεραιότητα της αντίδρασης πρέπει να παρακολουθείται μέσω της χρήσης ορού μάρτυρα με φυσιολογικές και μη φυσιολογικές τιμές γνωστών συγκεντρώσεων οξίνης φωσφατάσης.
2. Η οξίνη φωσφατάση στους μάρτυρες ορού είναι πιο ασταθής από ό,τι σε φρέσκους ορούς. Προσθέστε 20 uL (0,02 mL) ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος ανά 1,0 mL νερού που χρησιμοποιείται για την ανασύστασή του μάρτυρα ορού.

## Αναμενόμενες τιμές

Ολική οξίνη φωσφατάση: 0-9 u/L στους 30°C, 2,5-11,7 u/L στους 37°C

Προστατική οξίνη φωσφατάση: 0-3 u/L στους 30°C, 0,2-3,5 u/L στους 37°C

Οι τιμές προέρχονται από τη βιβλιογραφία.<sup>12</sup> Συνιστάται θερμά κάθε εργαστήριο να καθορίζει το δικό του εύρος.

## Επίδοση

1. Γραμμικότητα: 35 u/L στους 30°C, 40 u/L στους 37°C
2. Σύγκριση: Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αυτή με αντιδραστήριο του εμπόριου παρόμοιες σύστασης απέφερε τα παρακάτω αποτελέσματα:

N=26	Ολική	Προστατική
Συντελεστής συσχέτισης	0,998	0,994
Εξίσωση παλινδρόμησης	y=0,97x-0,40	y=0,97x-0,25

3. Ακρίβεια:

Εντός ανάλυσης (N=15)			Μεταξύ αναλύσεων (N=15)		
Μέση τιμή	S.D.	C.V.%	Μέση τιμή	S.D.	C.V.%
8,7	0,14	1,6 (Ολική)	3,7	0,28	7,6
33,3	0,29	0,9 (Ολική)	7,8	0,18	2,3
7,2	0,57	7,9 (Προστατική)	32,7	0,36	1,1
29,4	0,67	2,3 (Προστατική)			

## Βιβλιογραφία

1. Roy, A.V., et al. Clin. Chem. 17:1093 (1971).
2. Ewen, L.M., Spitzer, R.W., Clin. Chem. 22:627 (1976).
3. Babson, A.L., et al. Am. J. Clin. Path. 32:83 (1959).
4. Amador, E., et al. Am. J. Clin. Path. 51:202 (1969).
5. Hillman, G.Z., Klin. Chem. Klin. Biochem. 3:273 (1971).
6. Fabiny-Byrd, D.L., Erlingshausen, G., Clin. Chem. 13:841 (1972).
7. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p.614 (1976).
8. Ellis, G., et al. J. Clin. Path. 24:493 (1971).
9. Henry, R.J., Clin. Chem. Prin. And Tech., Hoeber, NY (1964).
10. Shaw, L.M., et al. Am. J. Clin. Path. 68:57 (1977).
11. Young, D.S., et al. Clin. Chem. 21:No.5 (1975).
12. Tietz, N.W., Fund. Of Clin. Chem. Philadelphia, W.B. Saunders, p.618 (1976).

## Υπόμνημα συμβόλων

Χρήση έως (EEEE-MM-HH)

**LOT** Παρτίδα και κωδικός παρτίδας

**REF** Αριθμός καταλόγου

Κατασκευαστής

**IVD** *In vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

Όρια θερμοκρασίας

Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

**Rx Only:** Χρήση μόνο με ιατρική συνταγή

Σήμανση CE

**EC REP** Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

**REF** A7503

Παρασκευάζεται από  
HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand  
5449 Research Drive Canton, MI 48188

2°C - 8°C

**IVD**

Παρασκευάζεται από την HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρώπη:  
Obelis s.a.  
Boulevard Général Wahis 53  
1030 Brussels, BE/ΓΙΟ  
Τηλ.: (32)2.732.59.54 Φαξ: (32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

**CE**

## Αντιδραστήρια πιστοποιημένα ως προς την απόδοση

Τα αντιδραστήρια της Pointe είναι πιστοποιημένα για παρασκευή σύμφωνα με καθορισμένες παραμέτρους. Οποιοδήποτε προϊόν αντιδραστηρίου της Pointe δεν πληροί τις προδιαγραφές έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης του θα αποκαθίσταται αμέσως χωρίς χρέωση.